

KARLA VIVIANI ALLEBRANDT

**BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA E INTOXICAÇÃO
POR AGROTÓXICOS**

Trabalho de conclusão de curso
para obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas,
desenvolvido no Laboratório de
Polimorfismos e Ligação do
Departamento de Genética da
Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof^a. Dr^a Eleidi A.
Chautard Freire Maia.

CURITIBA
1999

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a todos os meus queridos colegas do laboratório, pelo companheirismo e colaboração. Especialmente aos que dedicaram parte do seu tempo em atenção a esse trabalho.

À minha estimada orientadora, prof^a Eleidi A. Chautard Freire Maia pela incansável correção dos meus erros e pela lapidação das minhas idéias.

À mestrand Lupe Furtado, pela ajuda com a técnica de eletroforese e pelas sugestões para redação desse trabalho, mas principalmente pela sua amizade e franqueza.

Ao doutorando Ricardo R. L. Souza pela orientação sobre a BChE e por sua paciência em atender a todos os meus pedidos de auxílio.

À prof^a Vânia M. Alcântara pela orientação sobre a técnica de atividade enzimática.

Ao prof. Erasto Villa Branco Junior pela indicação da fonte para obtenção do material que viabilizou a realização de nosso projeto.

Ao Laboratório Central do Estado por ter cedido os soros e as fichas dos pacientes, particularmente à Angélica pela sua receptividade e interesse em colaborar com esse estudo.

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

À minha família por compreender minha ausência.

Ao Wellington pelo apoio e carinho.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 HISTÓRICO..... | 1 |
| 1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS COLINESTERASES | 2 |
| 1.2.1 Síntese, localização e função das colinesterases..... | 2 |
| 1.3. ASPECTOS GERAIS DA BChE | 3 |
| 1.3.1. Importância clínica do estudo da BChE..... | 4 |
| 1.4 VARIABILIDADE GENÉTICA DO LOCO <i>BCHE</i> | 4 |
| 1.4.1 Variantes diferenciadas por inibidores..... | 4 |
| 1.5 VARIABILIDADE GENÉTICA DO LOCO <i>CHE2</i> | 7 |
| 1.6 BChE E ORGANOFOSFORADOS | 7 |
| 1.6.1 Paraoxonase | 10 |
| 1.6.2 Inibição da BChE por compostos organofosforados e carbamatos | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 3.1 MATERIAL..... | 14 |
| 3.1.1 Coleta e seleção das amostras | 14 |
| 3.2 MÉTODOS LABORATORIAIS | 15 |
| 3.2.1 Atividade da BChE..... | 15 |
| 3.2.2 Fenotipagem do loco <i>BCHE</i> | 17 |
| 3.2.3 Fenotipagem do loco <i>CHE2</i> | 20 |
| 3.3 MÉTODOS NUMÉRICOS..... | 21 |
| 4. RESULTADOS | 22 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE INTOXICADOS E CONTROLES. | 22 |
| 4.2 VARIANTES DOS LOCOS <i>BCHE</i> E <i>CHE2</i> DAS AMOSTRAS DE INTOXICADOS E CONTROLES..... | 28 |
| 4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA..... | 28 |
| 5. DISCUSSÃO | 30 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 30 |
| 5.2 VARIÁVEIS DA BChE | 31 |
| 5.3 SEQUÊNCIA DO PRESENTE ESTUDO..... | 37 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 38 |
| 7. APÊNDICE | 44 |
| APÊNDICE 1. FICHA DE DADOS OCUPACIONAIS E CLÍNICOS DOS PACIENTES SUBMETIDOS AO EXAME DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE..... | 45 |
| APÊNDICE 2. CODIFICAÇÃO DOS DADOS DO LACEN..... | 46 |

RESUMO

A hipótese proposta por esse estudo foi de que a variabilidade genética da butirilcolinesterase humana (BChE; 3.1.1.8) possa influenciar no risco de intoxicação clínica por pesticidas organofosforados e/ou carbamatos. Constituiu-se em uma pesquisa piloto a partir da qual se pudessem obter informações para a elaboração de um projeto de tese viável e ao mesmo tempo suficiente para testar a hipótese mencionada. Foi examinada a atividade e a variabilidade genética da BChE referente aos locos *BCHE* e *CHE2*, em 63 lavradores considerados intoxicados por agrotóxicos e 40 controles (97,5% agentes de saúde), cujas informações e amostras de soro foram obtidas no Laboratório Central do Estado do Paraná. As frequências dos fenótipos do loco *BCHE*, determinadas com base em inibição enzimática, não se mostraram diferentes nessas amostras, tendo-se detectado apenas uma variante não usual entre os intoxicados (fenótipo *BCHE* UA; $1,59\% \pm 1,40\%$ E.P.) e nenhuma variante não usual entre os controles. As frequências dos fenótipos do loco *CHE2* também não se mostraram diferentes entre essas duas amostras, sendo as frequências do fenótipo *CHE2* C5+, respectivamente, $11,11\% \pm 3,96\%$ e $12,50\% \pm 5,23\%$, em intoxicados e controles. A atividade média da BChE se mostrou estatisticamente diferente entre essas duas amostras, tendo sido mais baixa nos intoxicados ($6,52$ U.I. $\pm 1,73$ D.P.) do que nos controles ($7,96$ U.I. $\pm 1,49$ D.P.). Talvez pela falta de informações clínicas, que permitissem melhor seleção do grupo intoxicado, os dados não foram suficientes para corroborar ou excluir a hipótese proposta. Vale salientar que a única variação não usual do loco *BCHE* foi encontrada em um dos 5 casos com sintomas de intoxicação descritos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

A colinesterase do soro tem propriedades bioquímicas e características distintas da colinesterase presente nos eritrócitos humanos (Alles e Hawes, 1940). A enzima eritrocitária, acetilcolinesterase, com alta afinidade para ésteres de colina, foi denominada a princípio como “colinesterase verdadeira”, enquanto que a colinesterase do soro, que hidrolisa outros ésteres além dos de colina, foi designada “pseudocolinesterase” (Mendel e cols., 1943). Segundo a nomenclatura sistemática da Comissão de Enzimas, a colinesterase verdadeira e a pseudocolinesterase são denominadas, respectivamente, como: acetilcolina-acetilhidrolase (E.C. 3.1.1.7) e acilcolina-acilhidrolase (E. C. 3.1.1.8). Outras denominações da colinesterase do soro são: esterase da benzoilcolina e butirilcolinesterase. O termo butirilcolinesterase é mais usado atualmente, daí, a sua abreviação BChE. A abreviação da acetilcolinesterase é AChE.

Na década de 50, com a introdução do suxametônio (succinil-dicolina) como relaxante muscular, foi verificado que alguns pacientes desenvolviam apnéia prolongada após sua administração como relaxante pré-operatório. Estudos de Kalow (1956) e Kalow e Genest (1957) demonstraram que esses indivíduos apresentavam variantes genéticas da BChE incapazes de hidrolisar a succinilcolina em doses fisiológicas, produzindo assim um relaxamento prolongado dos músculos voluntários. A primeira variante descrita foi denominada “atípica” devido ao seu comportamento anômalo frente ao inibidor dibucaína (Kalow, 1956; Kalow e Genest, 1957; Kalow e Staron, 1957). Desde então a variabilidade genética da BChE tem sido muito estudada e hoje são conhecidos, pelo menos, 39 alelos do loco *BCHE*.

Harris e cols. (1962; 1963) estudando as formas moleculares da BChE, por meio de técnicas eletroforéticas, detectaram uma banda extra que foi denominada de C₅. Concluíram também que essa banda era herdada independentemente das outras variantes genéticas do loco *BCHE*, evidenciando o não alelismo entre elas. Sendo assim, a variabilidade genética da BChE é determinada por 2 locos: *BCHE* e *CHE2*.

Arpagaus e cols. (1990) seqüenciaram o gene *BCHE*, responsável pela determinação da cadeia polipeptídica da BChE, e trabalhos recentes têm revelado as mutações responsáveis pelas variantes enzimáticas. A forma molecular C₅ surge da interação da butirilcolinesterase com o produto de outro loco, denominado *CHE2*, que codifica um outro tipo de substância.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS COLINESTERASES

As colinesterases hidrolisam ésteres de colina, a AChE e a BChE pertencem à classe de hidrolases séricas que hidrolisam outros ésteres além dos ésteres de colina e são inibidas pela fisostigmina 10^{-5} M (Augustinsson e Nachmansohn, 1949). Ambas são glicoproteínas e apresentam alto grau de homologia nas suas seqüências de aminoácidos e formas moleculares. São diferenciadas segundo o substrato preferencial, sensibilidade à inibição por compostos orgânicos e através do reconhecimento de anticorpos monoclonais (Aldridge, 1953; Cestaric, 1964; La Motta e Woronick, 1971; Brimijoin e cols., 1983). A AChE hidrolisa preferencialmente acetilcolina e é inibida quando esta se apresenta em altas concentrações, o que não ocorre com a BChE. A BChE hidrolisa diversos ésteres de colina, mas não hidrolisa acetil- β -metilcolina, que é hidrolisada pela acetilcolinesterase.

1.2.1 Síntese, localização e função das colinesterases

A butirilcolinesterase é sintetizada no fígado e encontrada em outras partes do corpo como: plasma, músculo liso, adipócitos, pâncreas, pele, massa branca do cérebro e coração. A função e o substrato natural da BChE ainda são desconhecidos, parecendo estar relacionada ao metabolismo de lípides, condução nervosa lenta, controle da permeabilidade de sódio e outros íons pela membrana e regulação dos níveis de colina e acetilcolina, que podem inibir a AChE. Não está particularmente associada a sinapses colinérgicas e possui maior afinidade por diferentes substratos que a AChE. Hidrolisa a butirilcolina mais rapidamente que a AChE, assim como outros ésteres, como a benzoilcolina, procaína, suxametônio e propranidina (um anestésico de curta duração), tendo importante papel na inativação dessas drogas (segundo Hang e Dale, 1991).

A totalidade da BChE e cerca de 1% da AChE consistem de subunidades catalíticas globulares, que constituem as formas solúveis encontradas no plasma. Em outros locais, as unidades catalíticas da AChE são ligadas a caudas tipo colágeno ou glicolipídios, através das quais são fixadas à membrana celular ou à membrana basal em vários locais como o eritrócito e a placa terminal motora.

A acetilcolinesterase, com cauda tipo colágeno, liga-se à membrana basal em sinapses colinérgicas, onde funciona hidrolisando o transmissor liberado (acetilcolina). A forma solúvel da AChE também pode estar presente nas fendas sinápticas das terminações nervosas colinérgicas, possivelmente controlando a concentração de acetilcolina livre. A função da forma ligada à membrana dos eritrócitos ainda é desconhecida (segundo Hang e Dale, 1991).

1.3 ASPECTOS GERAIS DA BChE

A enzima sérica consiste de várias formas moleculares, sendo que as 4 primeiras descritas foram designadas por Harris e cols. (1962) de C₁, C₂, C₃ e C₄ em ordem decrescente de mobilidade eletroforética. C₁ corresponde ao monômero, C₃ ao dímero, enquanto que C₂ é o monômero ligado à albumina por ligação covalente (Masson, 1989). O componente C₄, responsável por grande parte da atividade sérica da BChE, é um tetrâmero constituído por 4 subunidades idênticas, cada uma apresentando um sítio ativo (Lockridge e cols., 1979, 1987; Masson, 1979; Lockridge e La Du 1982).

Uma quinta forma molecular (C₅) foi descrita por Harris e cols., (1963) e se apresenta em apenas parte das populações (cerca de 10% em caucasóides), sendo também uma forma heteróloga resultante da ligação da BChE com substância ainda desconhecida.

Além dessas 5 formas moleculares da BChE, sabe-se que existem outras, uma vez que Juul (1968) identificou 12 formas moleculares após eletroforese em gel de poliacrilamida.

1.3.1 Importância clínica do estudo da BChE

A BChE participa do metabolismo de drogas que contêm ésteres, como AAS, heroína, aprophen, mivacurium, succinilcolina, certos derivados do ácido benzóico como procaina e do bambuterol, um broncodilatador de ação prolongada que é degradado enzimaticamente principalmente pela BChE. Exames que detectam atividade enzimática da BChE são utilizados como prova de função hepática e indicadores de intoxicação por compostos organofosforados e carbamatos, que são inibidores das colinesterases.

1.4 VARIABILIDADE GENÉTICA DO LOCO *BCHE*

O loco *BCHE* apresenta vários alelos: *BCHE*U* (usual), *BCHE*A* (atípico), *BCHE*F1*, *BCHE*F2* e *BCHE*F3* (resistentes ao fluoreto), *BCHE*J*, *BCHE*K*, *BCHE*H* e silenciosos, somando 39 alelos no total. Essas variações genéticas podem levar a diferenças na atividade e capacidade de inibição da butirilcolinesterase, conforme mostrado na tabela 1.

No presente trabalho os alelos de maior interesse são os detectáveis pela técnica de inibição enzimática, os quais tiveram suas frequências populacionais verificadas em trabalhos anteriores (Fadel-Picheth, 1991; Allebrandt e cols., 1998), dados que servirão para comparação com os da presente amostra.

1.4.1 Variantes diferenciadas por inibidores

Um dos inibidores utilizados nesse estudo, DL-propranolol é um β -bloqueador que proporciona inibição imediata e os perfis de inibição oferecem boa discriminação das variantes resistentes a inibidores. O outro é o RO2-0683, um carbamato que inibe a BChE de forma reversível.

O alelo *BCHE*U* determina a forma mais freqüente da BChE e a que apresenta maior inibição frente a esses inibidores; *BCHE*A* condiciona a enzima atípica que apresenta afinidade reduzida para substratos e inibidores que possuam carga positiva, sendo resistente ao anestésico local dibucaína; *BCHE*F1*, *BCHE*F2* e *BCHE*F3* são variantes

Tabela 1. Variabilidade do loco *BCHE* da butirilcolinesterase humana.

| Nome | Fenótipo | Alteração de aa. | Alter. de DNA | Alelo | Referências |
|---|--|--|--|---------------------|---------------------------|
| 1. Usual | normal | nenhuma | Nenhuma | <i>BCHE</i> | |
| 2. Neutra rara | normal | 255Glu→Asp | nt 764 GAG→GA? | <i>BCHE*255D</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| Resistentes a inibidores | | | | | |
| 3. Atípico | resistente à dibucaína | 70Asp→Gly | nt 209 GAT→GGT | <i>BCHE*70G</i> | McGuire e cols., 1989 |
| 4. Fluoreto-1 | resistente ao fluoreto | 243Thr→Met | nt 728 ACG→ATG | <i>BCHE*243M</i> | Nogueira e cols., 1992 |
| 5. Fluoreto-2 | resistente ao fluoreto | 390Gly→Val | nt 1169 GGT→GTT | <i>BCHE*390V</i> | Nogueira e cols., 1992 |
| 6. Fluoreto-3 | expressão red. res. ao fluoreto | 330Leu→Ile | nt 988 TTA→ATA | <i>BCHE*330I</i> | Sudo e cols., 1997 |
| Atividade diminuída frente a determinado substrato | | | | | |
| 7. SC | atividade reduzida frente à succinilcolina | 184Ala→Val | nt 551 GCC→GTC | <i>BCHE*184V</i> | Greenberg e cols., 1995 |
| Atividade diminuída em geral | | | | | |
| 8. K (Kalow) | atividade (70%) | 539Ala→Thr | nt 1615 GCA→ACA | <i>BCHE*539T</i> | Bartels e cols., 1992a |
| 9. J (James) | atividade (30%) | 497Glu→Val | nt 1490 GAA→GTA | <i>BCHE*497V</i> | Bartels e cols., 1992b |
| 10. H. (Hamersmith) | atividade (10%) | 142Val→Met | nt 424 GTG→ATG | <i>BCHE*142M</i> | Jensen e cols., 1992 |
| Atividade diminuída em geral (menor que 10% da usual ou ausente) | | | | | |
| 11. Silencioso | não há expressão fenotípica | 117Gly→Desl. de leitura, codon stop no aa. 129 | nt 351 GGT→GGAG | <i>BCHE*FS117</i> | Nogueira e cols., 1990 |
| 12. Silencioso | quantidade normal, inativa | 33Tyr→Cys | nt 98 TAT→TGT | <i>BCHE*33C</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 13. Silencioso | quantidade normal, inativa | 198Ser→Gly | nt 592 AGT→GGT | <i>BCHE*198G</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 14. Silencioso | quantidade normal, inativa | 201Ala→Thr | nt 601 GCA→ACA | <i>BCHE*201T</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 15. Silencioso | truncada | 271Glu→stop | nt 811 GAA→TAA | <i>BCHE*271STOP</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 16. Silencioso | truncada | 500Tyr→stop | nt 1500 TAT→TAA | <i>BCHE*500STOP</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 17. Silencioso | truncada | desl. no codon 6 (deleção) | nt 16 ATT→_TT | <i>BCHE*FS6</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 18. Silencioso | truncada | processamento alterado | nt -8 (intron 2- acceptor site) T→G | <i>BCHE*12E3-8G</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |

(continua)

Tabela 1. Variabilidade do loco *BCHE* da butirilcolinesterase humana (continuação).

| | | | | | |
|--|--------------------|----------------------------|---|---------------------|--|
| 19. Silencioso | expressão reduzida | 37Pro→Ser | nt 109 <u>CCT</u> → <u>TCT</u> | <i>BCHE*37S</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 20. Silencioso | expressão reduzida | 125Leu→Phe | nt 375 <u>TTA</u> → <u>TTT</u> | <i>BCHE*125F</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 21. Silencioso | expressão reduzida | 170Asp→Glu | nt 510 <u>GAT</u> → <u>GAG</u> | <i>BCHE*170E</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 22. Silencioso | expressão reduzida | 471Trp→Arg | nt 1411 <u>TGG</u> → <u>CGG</u> | <i>BCHE*471R</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 23. Silencioso | expressão reduzida | 518Gln→Leu | nt 1553 <u>CAA</u> → <u>CTA</u> | <i>BCHE*518L</i> | Primo-Parmo e cols., 1996 |
| 24. Silencioso | sem atividade | 355Lys→Ins. Alu (stop) | | <i>BCHE*ALU355</i> | Muratani e cols., 1991 |
| 25. Silencioso | sem atividade | 315Thr→Desl. (stop aa.330) | | <i>BCHE*FS315</i> | Hidaka e cols., 1992 |
| 26. Silencioso | | 465Arg→stop | nt 1393 <u>AGA</u> → <u>TGA</u> | <i>BCHE*465STOP</i> | Maekawa e cols., 1995 |
| 27. Silencioso | | 365Gly→Arg | nt 1093 <u>GGA</u> → <u>CGA</u> | <i>BCHE*365R</i> | Hada e cols., 1992 Hidaka e cols., 1992 |
| 28. Silencioso | | 250Thr→Pro | nt 748 <u>ACT</u> → <u>CCT</u> | <i>BCHE*250P</i> | Maekawa e cols., 1995 |
| 29. Silencioso | | 418Phe→Ser | nt 1253 <u>TTC</u> → <u>TCC</u> | <i>BCHE*418S</i> | Maekawa e cols., 1995 |
| 30. Silencioso | | 119Gln→stop | nt 355 <u>CAA</u> → <u>TAA</u> | <i>BCHE*119STOP</i> | Sudo e cols., 1996 |
| 31. Silencioso | | 515Arg→Cys | nt 1543 <u>CGT</u> → <u>TGT</u> | <i>BCHE*515C</i> | Maekawa e cols., 1995 |
| 32. Silencioso* | expressão reduzida | 4 Deleção Ile | nt 10-12 <u>CATCAT</u> → <u>CA</u> <u>T</u> | <i>BCHE*FS4</i> | Maekawa e cols., 1997 |
| 33. Silencioso* | expressão reduzida | 24Thr→Met | nt 71 <u>ACG</u> → <u>ATG</u> | <i>BCHE*24M</i> | Maekawa e cols., 1997 |
| 34. Silencioso* | expressão reduzida | 267Lys→Arg | nt 800 <u>AAA</u> → <u>AGA</u> | <i>BCHE*267R</i> | Maekawa e cols., 1997 |
| 35. Silencioso* | expressão reduzida | 100Pro→Ser | nt 298 <u>CCA</u> → <u>TCA</u> | <i>BCHE*100S</i> | Maekawa e cols., 1997 |
| Mutação com expressão não descrita | | | | | |
| 36. ND | não descrita | 425Ser→Pro | nt 1273 <u>TCC</u> → <u>CCC</u> | <i>BCHE*425P</i> | Gnatt e cols., 1990 |
| Mutação sinônima | | | | | |
| 37. Sinônima | usual | 470Arg→Arg | nt 1410 <u>CGT</u> → <u>CGG</u> | <i>BCHE</i> | Maekawa e cols., 1995 |
| Mutações em regiões não codificadoras | | | | | |
| 38. Exon 1 | usual | 2. Freq. 8% | nt - 116 G→A | <i>BCHE</i> | Bartels e cols., 1992a |
| 39. Exon 4 | usual | 3. Freq. 26% | nt 1914 A→G | <i>BCHE</i> | Bartels e cols., 1992a |

*Detectado em heterozigose com alelo usual. Dos 25 alelos silenciosos, 13 foram detectados nos U.S.A e 12 no Japão.

resistentes ao fluoreto e condificam a alozima com propriedade intermediária entre as das alozimas atípica e usual, na habilidade de hidrólise da succinilcolina.

1.5 VARIABILIDADE GENÉTICA DO LOCO *CHE2*

Sugere-se que esse loco dirija a produção de uma proteína com função diferente da BChE e que aparece ligada a ela em cerca de 10% da população caucasóide. A detecção dessa forma molecular heteróloga é feita por eletroforese, tendo sido denominada C₅ por apresentar menor migração que as outras 4 formas moleculares descritas antes dela, em eletroforese de gel de amido. O loco *CHE2* apresenta 2 alelos: *CHE2**C₅⁺ e *CHE2**C₅⁻, sendo o fenótipo *CHE2* C₅⁺ caracterizado pela presença dessa banda eletroforética extra (C₅), supostamente um tetrâmero da BChE ligado com uma proteína codificada pelo loco *CHE2* (Masson, 1991). O fenótipo *CHE2* C₅⁺ apresenta cerca de 25% mais atividade que o fenótipo *CHE2* C₅⁻ (segundo Harris, 1980).

Em trabalho de tese do nosso grupo de pesquisas (Alcântara e cols., 1999; com pessoal), foi sugerido que o aumento de atividade do fenótipo *CHE2* C₅⁺ não se deve apenas à presença adicional da forma molecular C₅, mas também ao aumento de outras formas moleculares.

1.6 BChE E ORGANOFOSFORADOS

Os compostos agrotóxicos organofosforados e carbamatos são potentes inibidores das colinesterases. A ação inibidora dos organofosforados se dá através da ligação do grupo fosforil à serina do sítio ativo, formando um complexo covalente fosforil-enzima muito estável. A ação dos carbamatos ocorre pela formação da ligação do grupo carbamoil à serina do sítio ativo.

Sabendo-se das implicações da variabilidade genética da BChE, sugeriu-se que pudesse haver diferença na susceptibilidade à intoxicação por agrotóxicos, de acordo com a variante enzimática que o indivíduo apresentasse.

Em um estudo populacional, realizado anteriormente no laboratório de Polimorfismos e Ligação - UFPR (Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia, 1996), foi demonstrado que a variabilidade da BChE, determinada geneticamente, influencia na susceptibilidade à inibição da Acetilcolinesterase eritrocitária (AChE). As pessoas examinadas nesse estudo não apresentavam sintomas de intoxicação. Foram estudados dois grupos de lavradores expostos a pesticidas: um grupo levemente intoxicado, e um grupo controle, não intoxicado, classificados com base na atividade da acetilcolinesterase eritrocitária. Os principais resultados obtidos se encontram na tabela 2.

Tabela 2. Associação da variabilidade da butirilcolinesterase com a inibição da acetilcolinesterase eritrocitária por agrotóxicos (45,9% organofosforados e 11,8% carbamatos), de acordo com Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996).

| Fenótipos | Intoxicados (%) | Controles (%) | RR; FP* p do teste χ^2 |
|--------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| Loco BCHE | | | |
| Usual | 86,9 | 98,3 | |
| Não usual | 13,1 (N = 61) | 1,7 (N = 59) | (RR = 8,8%) < 0,05 |
| Locos BCHE e CHE2 | | | |
| CHE2 C5 + Usual | 5,7 | 19,0 | |
| CHE2 C5 - Usual | 94,3 (N = 53) | 81,0 (N = 58) | (RR = 3,9%) < 0,05 |
| CHE2 C5 + Usual | 4,9 | 18,6 | (FP = 14,0%) |
| Outros | 95,1 (N = 61) | 81,4 (N = 59) | < 0,02 |

*RR = risco relativo

FP = fração preventiva

$$RR = \frac{X_a \cdot Y_c}{X_c \cdot Y_a}$$

$$FP = \frac{(1 - RR) \cdot f}{RR(1 - f) + f}$$

X = nº de indivíduos com dado fenótipo da BChE;

Y = nº de indivíduos com o outro fenótipo da BChE;

a = intoxicado;

c = controle;

f = frequência do fenótipo sob consideração no grupo intoxicado.

Em relação às variantes do loco *BCHE*, somente um fenótipo não-usual (*BCHE* UA) foi encontrado na amostra controle, enquanto que no grupo levemente intoxicado foram encontradas 8 variantes não-usuais, resultando em uma diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 4,11$, $p < 0,05$). Considerando-se apenas os fenótipos usuais em relação ao loco *CHE2*, os indivíduos com fenótipo usual *CHE2* C5- foram mais frequentes nos casos de intoxicação leve (94,3%), do que no grupo controle (81,0%; $\chi^2 = 4,45$, $p < 0,05$). Dividindo-se as amostras em casos usuais *CHE2* C5+ e os demais fenótipos, foi observada uma alta frequência de indivíduos usuais *CHE2* C5+ no grupo controle (18,6%) em relação ao grupo levemente intoxicado (4,9%), apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 5,49$, $p < 0,02$).

A análise desses resultados sugere que esses grupos sejam influenciados pela variabilidade da BChE, sendo que a inibição da acetilcolinesterase eritrocitária é visivelmente maior nos indivíduos não-usuais, sugerindo uma possível proteção dada pela butirilcolinesterase, quando na sua forma usual. Com relação ao loco *CHE2* a enzima usual que apresenta o complexo C5 tem maior resistência à intoxicação que a usual sem esse complexo, provavelmente pelo fato que, em média, esse fenótipo apresenta 25% mais atividade que o fenótipo *CHE2* C5- (Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia, 1996).

No presente trabalho, estudamos uma amostra de indivíduos com sintomas de intoxicação, para verificar se as variações, anteriormente estudadas, são capazes de alterar o risco de intoxicação. Padilla e cols. (1992) mostraram que perda significativa da AChE eritrocitária em ratos não produziu prejuízos neuro-comportamentais e não alterou a resposta do animal ao organofosforado paraoxon. Como os sintomas clínicos de intoxicação ocorrem quando a AChE cerebral é inibida, esses autores sugerem que a BChE não teria nenhum papel protetor no caso da intoxicação com repercussões clínicas. Outros relatos (Broomfield e cols., 1991; Wolfe e cols., 1992), entretanto, mostraram que a BChE age como protetora contra a toxicidade farmacológica e comportamental provocada por organofosforados em macacos Rhesus. O objetivo maior do presente estudo, é testar a hipótese de que a BChE possa ter papel protetor no processo de intoxicação com sintomas clínicos.

1. 6. 1 Paraoxonase

Os compostos organofosforados são inibidores das esterases em geral, a esterase-A (paraoxonase) é uma exceção, pois consegue hidrolisá-los (Aldridge, 1953). A enzima paraoxonase (PON) ou esterase A, tem substrato natural ainda desconhecido, mas parece estar relacionada ao metabolismo de lípides e à função de detoxicação dos pesticidas organofosforados. Essa enzima é produzida no fígado e liberada para a corrente sanguínea e pode detoxicar alguns inseticidas organofosforados, como o paration e os chlorpyrifos. O paration é inerte até ser transformado em paraoxon no organismo; a paraoxonase hidrolisa o paraoxon, produzindo p-nitrofenol. O grupo de pesticidas organofosforados chlorpyrifos produz neurotoxicidade via inibição das esterases no sistema nervoso central e periférico.

Foram encontradas duas formas geneticamente diferentes dessa enzima nas populações humanas. As duas formas da paraoxonase diferem quanto à sua atividade de hidrólise, sendo a variante Arg 192, muito mais ativa no sentido do paraoxon que a outra forma, Gln 192. Cerca de 50% da população é homozigota quanto ao alelo que codifica a Gln 192, cerca de 40% é heterozigota, e o remanescente (10%) é homozigota quanto ao alelo Arg 192 (National Institute of Environmental Health Sciences, 1998). O gene codificador da enzima se localiza no braço longo do cromossomo 7. Os alelos polimórficos desse gene que determinam diferentes níveis de PON influenciam na sensibilidade dos indivíduos aos inseticidas organofosforados (The Environmental Genome Project Candidate Gene List, 1998).

1.6.2 Inibição da BChE por compostos organofosforados e carbamatos

As manifestações clínicas das intoxicações, devidas à inibição das colinesterases, são decorrentes do acúmulo do neurotransmissor acetilcolina que atua sobre os receptores muscarínicos e nicotínicos e no SNC, causando disfunções pelo excesso de estímulo. Os sintomas vão depender da via de absorção relacionada, à quantidade do produto absorvido e ao tempo de exposição. Quanto às manifestações clínicas provocadas pelo excesso de acetilcolina, podemos citar: a) efeitos muscarínicos - anorexia, náuseas, vômitos, dores abdominais, aumento da amplitude das contrações e peristaltismo gastrointestinais, diarreia, aumento da secreção das glândulas exócrinas com sudorese excessiva, sialorréia, lacrimejamento e distúrbios respiratórios como dispnéia, cianose e acúmulo de secreções

nos brônquios, podendo levar ao edema pulmonar agudo; b) efeitos nicotínicos - tremores de língua, lábios, olhos, espasmos e fasciculações musculares, seguidas por flacidez e paralisia; c) SNC - cefaléia, tontura, tremores, ataxia, distúrbios da palavra, convulsões tônico-clônicas e coma (Segundo Brito-Filho, 1988).

Em relação à parte do organismo afetada, podemos observar as manifestações relacionadas na tabela 3.

Tabela 3. Relação de sintomas de intoxicação provocados por excesso de acetilcolina, classificados de acordo com a parte afetada do organismo.

| Categoria | Parte Afetada | Sintomas Comuns |
|------------------|----------------------------|--|
| Respiratória | Nariz, traquéia e pulmões | Irritação nasal, tosse, dispnéia. |
| Gastrointestinal | Estômago e intestinos | Náusea, vômito e diarreia. |
| Renal | Rins | Dor lombar, enurese excessiva ou reduzida. |
| Neurológica | Coluna vertebral e cérebro | Cefaléia, tontura, distúrbios de orientação, depressão, coma e convulsões. |
| Hematológica | Sangue | Anemia, cansaço e fraqueza. |
| Dermatológica | Pele e olhos | Prurido, rubor, edema e raches cutâneos. |
| Reprodutiva | Ovários, testículos e feto | Infertilidade e aborto. |

(EXTOXNET Pesticide Information Notebook, 1998).

O quadro clínico nem sempre inclui todas essas manifestações, o que depende do grau de intoxicação. A determinação da atividade das colinesterases pode indicar intoxicação sem aparente sintomatologia clínica.

A manifestação da intoxicação pode ser aguda ou crônica, sendo que a crônica se dá pela absorção diária de pequenas doses. Os efeitos inibitórios da atividade das colinesterases podem permanecer por várias semanas, podendo conseqüentemente ocasionar intoxicação e aparecimento da sintomatologia, após um determinado período de exposição ao agente tóxico.

Consideramos que estudos como o do presente trabalho são de importância para as populações rurais brasileiras, tão expostas ao uso inapropriado dos agrotóxicos. No Estado do Paraná, no qual as atividades agrícolas são de extrema importância para a economia, o número de casos registrados de intoxicação por agrotóxicos é relevante. Em 1996, de acordo com a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, foram registrados 633 casos de

intoxicação por agrotóxicos, sendo que cerca de 38% foram relatados como devidos a inibidores da BChE (organofosforados e carbamatos). Além disso, os organofosforados representaram o grupo químico mais utilizado no Paraná no ano de 1996 (tabela 4).

Tabela 4. Intoxicações por agrotóxicos no Paraná em 1996, segundo o grupo químico*.

| Tipo | Nº de IND | Porcentagem |
|-------------------------|------------------|--------------------|
| Não definido | 73 | 11,5 % |
| Agrot. Ignorado | 124 | 19,6 % |
| Bipiridílios | 28 | 4,4 % |
| Carbamato | 28 | 4,4 % |
| Éster | 4 | 0,6 % |
| Glifosato | 39 | 6,2 % |
| OGF+ Éster | 1 | 0,2 % |
| OGF+ piretróides | 10 | 1,6 % |
| Organoclorado | 12 | 1,9 % |
| Organofosforado | 199 | 31,5 % |
| Outros | 99 | 15,6 % |
| Piretróides | 16 | 2,5 % |
| TOTAL | 633 | 100,0 % |

*Informações obtidas na Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.
OGF: organofosforado.

2. OBJETIVOS

A finalidade principal do presente trabalho é testar a hipótese de que a variabilidade genética da BChE possa ter papel diferencial no processo de intoxicação clínica por agrotóxicos. Os principais objetivos do presente estudo são:

- 1) Verificar a variabilidade dos locos *BCHE* e *CHE2* em amostra populacional de indivíduos com intoxicação clínica, produzida por agrotóxicos.
- 2) Comparar as frequências de variantes dos locos *BCHE* e *CHE2* encontradas em intoxicados com as amostras de controles.
- 3) Calcular riscos relativos de intoxicação para os diferentes fenótipos, bem como os valores das frações etiológica e preventiva, caso haja diferença nas distribuições de frequências de variantes entre intoxicados e controles.
- 4) Desenvolver esse estudo com os dados disponíveis pelo Laboratório Central do Estado, de modo a servir como uma pesquisa piloto a partir da qual tenhamos informações para elaborar um projeto de tese de mestrado viável e suficiente para testar a hipótese anteriormente mencionada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Coleta e seleção das amostras

A coleta do material proveniente do Laboratório Central do Estado (LACEN) teve início em setembro de 1998 e se deu até janeiro de 1999. A princípio entramos em contato com outras instituições, como o Centro de Informações Toxicológicas da Secretaria do Estado da Saúde, para que o material fosse coletado em pronto atendimento dos hospitais da região metropolitana de Curitiba, mas devido ao tempo de que dispúnhamos e à baixa incidência de casos de intoxicação na região metropolitana, esse procedimento se tornou inviável. Dessa forma procuramos o LACEN, que presta serviço aos Postos de Saúde do Paraná e recebe soros de indivíduos supostamente intoxicados por agrotóxicos, e iniciamos a coleta desse material. Estudamos 103 indivíduos, os quais foram separados em duas classes: prováveis intoxicados ($N = 63$) e controles ($N = 40$).

Foram considerados como supostamente intoxicados os indivíduos com descrição de sintomatologia ($N = 5$) e aqueles que devido à sua profissão teriam contato direto com o agrotóxico, como agricultores. Nessa classe incluímos também os menores, os quais se supõe terem sido expostos a agrotóxicos pelo fato de estarem fazendo um exame diagnóstico para intoxicação, bem como os indivíduos sobre os quais não temos informações ocupacionais.

A amostra controle é formada por agentes de saúde, que fazem o exame regular da atividade da BChE, com exceção de 1 caso que não se trata de agente de saúde (professora) inserido nessa amostra por não se enquadrar no grupo de supostamente intoxicados. Esses agentes de saúde fazem a dedetização de focos suspeitos de *Aedes aegypti*, vetor biológico da dengue.

Por intermédio do Laboratório Central do Estado (LACEN) obtivemos além dos soros, as fichas dos pacientes, onde constam dados da atividade da BChE, sintomatologia, profissão e causa da contaminação, entre outros (ver ficha de questionário no Apêndice 1).

3.2 Métodos laboratoriais

3.2.1 Atividade da BChE

Os valores de atividade da BChE, determinados pelo LACEN, foram obtidos segundo o método de Dietz e cols., (1973) modificado, utilizando o kit “Colinesterase” produzido pela Doles Reagentes e Equipamentos. O princípio dessa técnica é a hidrólise do substrato propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina. A tiocolina reage com o DTNB, gerando o íon de coloração amarela 5-tio-2-nitrobenzoato. Na tabela 5 encontra-se o protocolo da técnica.

Tabela 5. Protocolo da técnica para avaliar a atividade da butirilcolinesterase.

| Tubos | Branco | Teste |
|--|--------|-------|
| Substrato | 1,0mL | 1,0mL |
| Reagente de cor | 3,0mL | 3,0mL |
| Colocar em banho-maria, 37 ^o C, durante 3 minutos. | | |
| Amostra | | 20µL |
| Incubar a 37 ^o C por exatamente 2 minutos e 30 segundos. | | |
| Solução inibidora | 3,0mL | 3,0mL |
| Amostra | 20µL | - |
| Homogeneizar e ler a absorbância do tubo Teste (A. T.) em espectrofotômetro ou fotocolorímetro ajustado em 410 nm, acertando o zero com o branco. A cor final permanecerá estável por 15 minutos, à temperatura ambiente (20-30 ^o C). | | |

O kit Colinesterase Doles possui um padrão no intervalo de linearidade da metodologia adotada. O laboratório deve realizar o ensaio padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F). O fator deve ser refeito periodicamente a cada lote do produto. Para determinação do fator de calibração, deve-se rotular um tubo de ensaio com **B** (branco) e 3 tubos de ensaio com **P** (padrão) e proceder como na tabela 6.

Tabela 6. Protocolo para determinação das absorbâncias das soluções padrão.

| Tubos | B | P | P | P |
|---|-------|-------|-------|-------|
| Água destilada | 4,0mL | 4,0mL | 4,0mL | 4,0mL |
| Solução padrão | - | 20µL | 20µL | 20µL |
| Reagente de cor | 3,0mL | 3,0mL | 3,0mL | 3,0mL |
| Homogeneizar e ler as absorbâncias em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em 410 nm, acertando o zero com o branco. | | | | |

Utilizando-se a média das absorbâncias dos tubos P, calcula-se o fator (F):

$$F = 7/\text{absorbância P (média)}$$

$$\text{Atividade da Butirilcolinesterase (U.I./mL)} = A. T. \times F$$

A expressão dos resultados em unidades do Sistema Internacional será:

$$\text{Atividade da Butirilcolinesterase (U.I./L)} = \text{Butirilcolinesterase (U.I./mL)} \times 1000$$

Uma U.I. de Butirilcolinesterase é a quantidade de enzima que hidrolisa um µmol de substrato/minuto/mL de soro, 37°C.

No preparo dos reagentes para determinação da atividade da BChE, levam-se em conta as informações que serão expostas em seguida.

- 1) Substrato: cada frasco contém 45 µmol de Iodeto de Propioniltiocolina sob forma liofilizada. Solução uso: adicionar 4,5 mL de água destilada ou deionizada ao frasco que contém o liofilizado. O reagente permanecerá estável por 30 dias, à temperatura de 2-6°C, ou 120 dias se mantido congelado.
- 2) Reagente de cor: solução 0,423M de 5,5-Dithiobis-(Ácido 2-Nitrobenzóico) em tampão de fosfatos pH 7,6.
- 3) Solução inibidora: sulfato de quinidina a 0,5%.
- 4) Solução padrão: 20µl do padrão corresponde a 7 U.I./mL dentro da metodologia adotada. Solução para uso: reconstituir a solução com adição de 3 mL de água destilada. O padrão permanece estável por 6 meses, se mantido congelado.
- 5) Tampão fosfato (0,1M) pH 7,6.

3.2.2 Fenotipagem do loco *BCHE*

A fenotipagem do loco *BCHE* foi feita pelo método de inibição enzimática (Alcântara e cols., 1991; Picheth e cols., 1994, com modificações), como especificado na tabela 7.

A fenotipagem dos indivíduos se estendeu por 3 fases:

- 1^a) Inibição enzimática das amostras de soro utilizando-se somente DL-Propranolol como inibidor, rastreando-se os indivíduos não usuais;
- 2^a) Repetição do mesmo procedimento, aplicado somente aos indivíduos caracterizados como não usuais, para confirmação do resultado anterior;
- 3^a) Retipagem das amostras que persistiram como não usuais na 2^a fase, sendo testadas com dois inibidores. Além do DL-Propranolol também foi utilizado o RO2-0683 [dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxi-5-fenilbenzil)-trimetil amônio].

Para fenotipagem, os soros foram descongelados em banho-maria a 37°C, temperatura ideal para atuação da enzima, e diluídos em tampão fosfato pH 7,1. As alíquotas de cada soro diluído foram adicionadas aos seus respectivos tubos (em banho-maria 37°C) na seguinte ordem: tubo controle com tampão fosfato + substrato (alfa-naftilacetato) e tubos teste com inibidores (DL-Propranolol + substrato - 2^a fase; DL-Propranolol + substrato e RO2-0683 + substrato - 3^a fase). O tempo de reação foi de 30 minutos incluindo o tempo para adicionar o soro diluído.

Após o tempo de reação foi adicionado o corante "Fast Red TR" (Sigma 37085) e a solução depois de agitada resultou na coloração de rosa a vinho, intensificada durante cerca de 10 minutos no banho-maria. As leituras das absorbâncias foram feitas com espectrofotômetro CELM/E-225 D em 540 nm. O aparelho foi zerado, primeiramente, com água destilada e depois foi feita a leitura do tubo branco, zerando-se novamente o aparelho, para posterior leitura do tubo controle e tubos com inibidores, intercalando o branco entre a leitura de um indivíduo e outro.

Tabela 7. Protocolo da técnica de inibição enzimática.

| Reagentes (mL) | Tubos de ensaio (mL) | | | |
|---|----------------------|----------|----------------|--------|
| | Controle | RO2-0863 | DL-Propranolol | Branco |
| Tampão fosfato (0,2 M; pH 7,1) | 0,2 | _____ | _____ | 0,7 |
| RO2-0683 (5 x 10 ⁻⁶ M) | _____ | 0,2 | _____ | _____ |
| DL-Propranolol (1,35 x 10 ⁻⁴ M) | _____ | _____ | 0,2 | _____ |
| α-Naftilacetato (3 x 10 ⁻⁴ M) | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Incubar 5 minutos a 37°C | | | | |
| *Soro (1/200 em tampão fosfato) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | _____ |
| Incubar 30 minutos a 37°C | | | | |
| Fast red TR salt, 40mg, em 10 mL de Duponal 3% (p/v) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

*Na técnica original (Alcântara e cols., 1991; Picheth e cols., 1994) a diluição da amostra é de 1/100, modificada para 1/200 (Allebrandt e cols., 1998).

Os valores de absorbância foram aplicados a uma fórmula e os resultados de percentagem de inibição (PN, RON) comparados a uma tabela que indicou os possíveis fenótipos dos indivíduos, conforme exemplificado a seguir.

Os números de inibição se referem à proporção entre os valores da absorbância do tubo controle em relação aos respectivos valores dos tubos contendo inibidores.

$$\text{RON} = 100(\text{AC}-\text{AR})/\text{AC}$$
$$\text{PN} = 100(\text{AC}-\text{AP})/\text{AC}$$

Onde AC, AR e AP correspondem às absorbâncias dos tubos controle, RO2-0683 e DL-Propranolol, respectivamente.

Utilizaram-se os dados obtidos por Picheth e cols., (1994) como de referência para classificação dos diferentes fenótipos da BChE (tabela 8).

Tabela 8. Números de inibição obtidos com os inibidores DL-Propranolol (PN) e RO2-0683 (RON) e utilizados na classificação dos fenótipos variantes.

| Fenótipo | PN Limite de variação | RON 4. Limite de variação |
|----------|--------------------------|------------------------------|
| BCHE U | 69-79 | 86-93 |
| BCHE UF | 55-70 | 76-87 |
| BCHE UA | 43-56 | 54-67 |
| BCHE AK | 36-40 | 44-49 |
| BCHE AF | 24 | 46 |
| BCHE A | 2-3 | 10-11 |

Para o preparo dos reagentes para o teste de fenotipagem por inibição enzimática levaram-se em conta as informações que serão expostas a seguir.

1) Tampão fosfato 0,2 M; pH 7,1:

a) Fosfato bibásico de sódio 0,2 M (PM 141,96g/mol)

Na_2HPO_4 anidro (2,8g) em H_2O q.s.p. 100 mL;

b) Fosfato monobásico de sódio 0,2 M (PM 137,99g/mol)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2,76g) em H_2O q.s.p. 100 mL;

Misturar 67mL da solução “a” com aproximadamente 33mL da solução “b” ajustando o pH em 7,1;

2) Preparo da solução estoque de alfa-naftilacetato (30 mM em acetona): alfa-naftilacetato (56 mg), acetona p.a. (5 mL) e H_2O (5 mL). Essa solução deve ser armazenada a 4° C, com durabilidade de 25 dias. A solução de uso de alfa-naftilacetato corresponde a 1 mL da solução estoque diluída em 20 mL de tampão fosfato e H_2O destilada em q.s.p. 100 mL de solução, resultando na concentração final de 3×10^{-4} M. Essa solução deve ser preparada imediatamente antes do uso.

3) Inibidor RO2-0683 na concentração de 5×10^{-3} mM: solução estoque 1 mM (0,050 mL) diluída em tampão fosfato pH 7,1 (10 mL).

4) Inibidor DL-Propranolol na concentração de 0,135 mM: solução estoque 3,38 mM (0,2 mL) diluída em tampão fosfato pH 7,1 (4,8 mL).

5) O soro é diluído de 1/200 em tampão fosfato pH 7,1.

6) Reagente de cor: dissolvem-se 40 mg de Fast Red TR salt em 6 mL de H_2O destilada, acrescentando-se posteriormente 4 mL de Lauril sulfato de sódio 3% p/v (PM=288,4).

3.2.3 Fenotipagem do loco *CHE2*

A fenotipagem do loco *CHE2* foi realizada por método de eletroforese em gel de ágar ácido. Esta técnica foi desenvolvida por Robinson e cols., (1957) para determinar fenótipos da hemoglobina e posteriormente, foi aplicada por Van Ros e Vervoort (1973) para a butirilcolinesterase. No presente trabalho seguimos as modificações apresentadas por Fadel-Picheth (1991) e Souza (1995).

O gel de ágar foi preparado com uma solução de bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,50. Essa solução é aquecida por cerca de sete minutos ou até que o ágar esteja totalmente dissolvido, sendo importante não deixar a solução ferver. Após o aquecimento a solução é vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel deve resfriar completamente e então ser colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas, a fim de diminuir o efeito da eletroendosse. Após este período de repouso, as amostras são aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina (5 x 5 x 0,1 mm) onde é colocado 1,5 µl de plasma ou soro. A placa contendo as amostras é submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,7 nas cubas, por três horas. A corrida eletroforética é realizada a 4°C com aplicação de cerca de 35 mA e de 70 V. Após a corrida eletroforética despeja-se sobre a placa o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso. A placa com o cromógeno-substrato deve ser incubada por uma hora a 37°C. Após a revelação das bandas lava-se a placa com água para retirar o excesso de corante. O gel é então colocado entre uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro para secagem. O gel coberto pelo papel cartão e pelo papel filtro é colocado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37°C até completa secagem. A folha de papel filtro deve ser trocada após 10 minutos para retirar o excesso de umidade.

No preparo dos reagentes para a eletroforese em gel de ágar, foram consideradas as informações expostas a seguir:

- 1) Gel de ágar 1,4%; pH 6,4:
 - a) 5 mL de tampão citrato 6,5 em água destilada q.s.p. 50 mL, ajustar o pH 6,4 com ácido cítrico;
 - b) 0,7g de ágar para diluição em 50 mL da solução “a”;
- 2) Tampão citrato pH 6,5:

- a) Pesar 147g de citrato de sódio bihidratado, diluir em 700 mL de água destilada deionizada ;
 - b) Ajustar o pH em 6,5 utilizando uma solução de ácido cítrico.
 - c) Completar com q.s.p. 1000 mL com água destilada deionizada e distribuir o volume em 2 frascos de 1L (armazenar em freezer).
- 3) Cromógeno:
- a) 150g de Fast Red TR/salt em tampão fosfato pH 7,1 (60 mL) e solução estoque de alfa-naftilacetato (2,1 mL);
 - b) Preparo da solução estoque: alfa-naftilacetato (1 mM) e tampão fosfato pH 7,1, segundo as instruções do preparo dos reagentes para fenotipagem por inibição enzimática (item 4.2.2.).

3.3 Métodos numéricos

A análise estatística dos dados foi feita principalmente com o auxílio do programa STATISTICA. Foram calculadas distribuições de frequência, médias, desvios e erros padrão, sendo utilizados os testes t , χ^2 e F para as comparações entre as amostras de intoxicados e controles, bem como para comparações com dados da literatura. No caso do teste χ^2 , se aplicou a correção de Yates, sempre que o esperado foi menor do que 5.

A codificação das variáveis foi feita de acordo com o Apêndice 2.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das amostras de intoxicados e controles.

A tabela 9 apresenta as frequências das categorias de ocupação dos intoxicados e seus controles. As frequências de casos de intoxicação classificados por município se encontram na tabela 10. Os casos de intoxicação foram centralizados principalmente em dois municípios, Antônio Olinto e Prudentópolis (39,68% cada). Uma pequena parcela de casos restantes ocorreu em outros 6 municípios (somando 14,29%) e algumas fichas não apresentaram identificação de procedência (6,35%). Na tabela 11 são classificados os controles, com relação ao município de origem. Os controles predominam dentro da regional de Paranavaí (95,0%), sendo que somente 2 indivíduos (5%) aparecem em outras regionais.

A média da idade dos indivíduos das amostras intoxicada e controle não diferiu significativamente (tab. 12). Entretanto, as variâncias das duas amostras com relação à idade foram diferentes ($F = 2,54$, $p < 0,01$), sendo a maior variância verificada no grupo intoxicado.

Conforme mostrado na tabela 13, houve frequência mais alta do sexo masculino em ambas as amostras (92,50% em controles, $\chi^2_{(1)} = 28,90$, $p < 0,001$; 68,25% em intoxicados, $\chi^2_{(1)} = 8,40$, $p < 0,01$). Além disso, a frequência de homens é significativamente maior nos controles do que nos intoxicados ($\chi^2_{(1)} = 8,29$, $p < 0,01$).

Quanto à escolaridade (tab. 14), verificamos que na amostra de supostos intoxicados ocorreu 20,63% de analfabetismo, 1,58% de indivíduos que fizeram o pré-escolar e 4,77% com o 1º grau incompleto, sendo que em 73,00% dos casos as fichas estavam incompletas para essa informação. Quase metade dos agentes de saúde (42,50%) possui 2º grau completo; 12,50%, o 2º grau incompleto e 35,00%, o 1º grau completo. Neste grupo, o menor nível de escolaridade encontrado foi o 1º grau incompleto em 7,50% dos casos.

Na amostra de supostos intoxicados, o uso de proteção foi verificado em apenas 19,15% dos agricultores, 17,02% admitiu não usar proteção e em 63,83% dos casos não tivemos essa informação (tab. 15). A tabela 16 apresenta o tempo de serviço para o grupo de agricultores.

A sintomatologia foi descrita em apenas 5 casos (7,94%): 3 com problemas gastrointestinais, 1 com distúrbio gastrointestinal associado a comprometimento do sistema nervoso e 1 com problemas de ordem circulatória. Dos outros 58 pacientes (92,06%) não tivemos informações sobre a sintomatologia porque as fichas estavam incompletas.

Tabela 9. Frequência ocupacional (± E.P.) dos indivíduos controles e intoxicados.

| Ocupação | Controles | | Intoxicados | |
|-----------------|-----------|---------------------------|-------------|---------------------------|
| | N | Frequência (%) ± E.P. (%) | N | Frequência (%) ± E.P. (%) |
| Sem* | 0 | _____ | 8 | 12,70 ± 4,19 |
| Agricultor | 0 | _____ | 47 | 74,60 ± 5,48 |
| Agente de Saúde | 39 | 97,50 ± 2,46 | 0 | _____ |
| Outras | 1 | 2,50 ± 2,46 | 1 | 1,59 ± 1,59 |
| Desconhecida | 0 | _____ | 7 | 11,11 ± 4,00 |
| Total | 40 | 100,00 | 63 | 100,00 |

*Crianças

Tabela 10. Municípios que apresentaram casos de intoxicação e suas respectivas frequências ± E.P.

| Município | Regional | N | Frequência (%) de Intoxicação | ± E. P. (%) |
|----------------------|------------------|----|-------------------------------|-------------|
| Amaporã | Paranavaí | 1 | 1,59 | 1,57 |
| Antônio Olinto | União da Vitória | 25 | 39,68 | 6,16 |
| Araucária | Metropolitana | 2 | 3,17 | 2,21 |
| Campo Largo | Metropolitana | 3 | 4,76 | 2,68 |
| Paranavaí | Paranavaí | 1 | 1,59 | 1,57 |
| Prudentópolis | Guarapuava | 25 | 39,68 | 6,16 |
| Rio Negro | Metropolitana | 1 | 1,59 | 1,57 |
| São José dos Pinhais | Metropolitana | 1 | 1,59 | 1,57 |
| Desconhecidos | | 4 | 6,35 | 3,07 |
| TOTAL | | 63 | 100,00 | |

Tabela 11. Municípios que apresentaram controles e suas respectivas frequências \pm E.P.

| Município | Regional | N | Frequência (%) de agentes de saúde | \pm E. P. (%) |
|-----------------------------|------------------|-----------|---|---------------------------------------|
| Amaporã | Paranavaí | 2 | 5,0 | 3,45 |
| Antônio Olinto | União da Vitória | 1 | 2,5 | 2,47 |
| Coronel Domingos Soares | Pato Branco | 1 | 2,5 | 2,47 |
| Cruzeiro do Sul | Paranavaí | 1 | 2,5 | 2,47 |
| Diamante do Norte | Paranavaí | 2 | 5,0 | 3,45 |
| Jardim Olinda | Paranavaí | 1 | 2,5 | 2,47 |
| Inajá | Paranavaí | 2 | 5,0 | 3,45 |
| Itaúna do Sul | Paranavaí | 2 | 5,0 | 3,45 |
| Mirador | Paranavaí | 1 | 2,5 | 2,47 |
| Nova Aliança do Ivaí | Paranavaí | 1 | 2,5 | 2,47 |
| Paranavaí | Paranavaí | 2 | 5,0 | 3,45 |
| Porto Rico | Paranavaí | 2 | 5,0 | 3,45 |
| Santo Antônio do Caiuá | Paranavaí | 1 | 2,5 | 2,47 |
| Santa Cruz do Monte Castelo | Paranavaí | 5 | 12,5 | 5,23 |
| São Carlos do Ivaí | Paranavaí | 2 | 5,0 | 3,45 |
| São João do Caiuá | Paranavaí | 1 | 2,5 | 2,47 |
| São Pedro do Paraná | Paranavaí | 2 | 5,0 | 3,45 |
| Terra Rica | Paranavaí | 5 | 12,5 | 5,23 |
| Nova Londrina | Paranavaí | 6 | 15,0 | 6,64 |
| TOTAL | | 40 | 100,0 | |

Tabela 12. Média da idade dos intoxicados e controles e resultados dos testes t e F.

| Amostras | N | Idade Média ± D. P. | Mínimo | Máximo |
|-------------------|----|---------------------|--------------------|--------|
| Controle | 39 | 29,79 ± 8,74 | 19 | 54 |
| Intoxicada | 63 | 28,67 ± 13,94 | 5 | 66 |
| t = 0,50 p > 0,60 | | | F = 2,54; p < 0,01 | |

Tabela 13. Frequências sexuais dos indivíduos controles e intoxicados e resultados dos testes χ^2 aplicados.

| SEXO | Controle | | Intoxicados | |
|-----------------------------------|----------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| | N | Frequência (%) ± E.P. (%) | N | Frequência (%) ± E.P. (%) |
| Masculino | 37 | 92,50 | 43 | 68,25 |
| Feminino | 3 | 7,50 | 20 | 31,75 |
| | 40 | 100,00 | 63 | 100,00 |
| $\chi^2_{(1)} = 28,90; p < 0,001$ | | | $\chi^2_{(1)} = 8,40; p < 0,01$ | |
| $\chi^2_{(1)} = 8,29; p < 0,01$ | | | | |

Tabela 14. Frequências de graus de escolaridade (\pm E.P.) dos indivíduos controles e intoxicados.

| Escolaridade | Controles | | Intoxicados | |
|--------------------------------|-----------|-------------------------------|-------------|-------------------------------|
| | N | Frequência (%) \pm E.P. (%) | N | Frequência (%) \pm E.P. (%) |
| Sem | 0 | _____ | 13 | 20,63 \pm 5,10 |
| Pré-escolar | 0 | _____ | 1 | 1,58 \pm 1,57 |
| 1 ^o grau incompleto | 3 | 7,50 \pm 4,16 | 3 | 4,77 \pm 2,68 |
| 1 ^o grau completo | 14 | 35,00 \pm 8,10 | 0 | _____ |
| 2 ^o grau incompleto | 5 | 12,50 \pm 5,22 | 0 | _____ |
| 2 ^o grau completo | 17 | 42,50 \pm 7,82 | 0 | _____ |
| Desconhecida | 1 | 2,50 \pm 2,47 | 46 | 73,00 \pm 5,59 |
| Total | 40 | 100,00 | 63 | 100,00 |

Tabela 15. Frequência (\pm E.P.) do uso de proteção nos agricultores supostamente intoxicados.

| Proteção | | Frequência (%) \pm E.P. (%) |
|--------------|----|-------------------------------|
| Usa | 9 | 19,15 \pm 5,74 |
| Não usa | 8 | 17,02 \pm 5,48 |
| Desconhecida | 30 | 63,83 \pm 7,01 |
| Total | 47 | 100,00 |

Tabela 16. Frequência (\pm E.P.) do tempo de serviço dos agricultores da classe considerada intoxicada.

| Tempo | | Frequência (%) \pm E.P. (%) |
|---------------------|----|---|
| Até 10 anos | 13 | 27,66 \pm 6,52 |
| 11-20 anos | 7 | 14,89 \pm 5,19 |
| 21-30 anos | 1 | 2,13 \pm 2,10 |
| 31-40 anos | 1 | 2,13 \pm 2,10 |
| 50-60 anos | 1 | 2,13 \pm 2,10 |
| Desconhecido | 24 | 51,06 \pm 7,29 |
| Total | 47 | 100,00 |

4.2 Variantes dos locos *BCHE* e *CHE2* das amostras de intoxicados e controles.

Das 63 amostras de indivíduos considerados intoxicados e analisados para o loco *BCHE*, por inibição enzimática, apenas uma apresentou uma variante não usual, sendo de um heterozigoto *BCHE* UA ($1,59\% \pm 1,60\%$). Entre as 40 amostras de controles não se encontrou nenhuma variação não usual.

A determinação dos fenótipos do loco *CHE2* (Fig. 1) mostrou uma freqüência de $11,11\% \pm 3,96\%$ de indivíduos *CHE2* C5+ em intoxicados e de $12,50\% \pm 5,23\%$, nos controles (tab. 17). Essas freqüências podem ser consideradas iguais estatisticamente ($\chi^2_{(1)} = 0,01$; $p > 0,90$).

4.3 Atividade enzimática

As médias dos valores de atividade da BChE foram comparadas entre as duas amostras (intoxicados e controles), mostrando que o grupo intoxicado apresentou atividade média mais baixa que o controle (tab. 18). As duas distribuições de atividade não diferem quanto à variância.

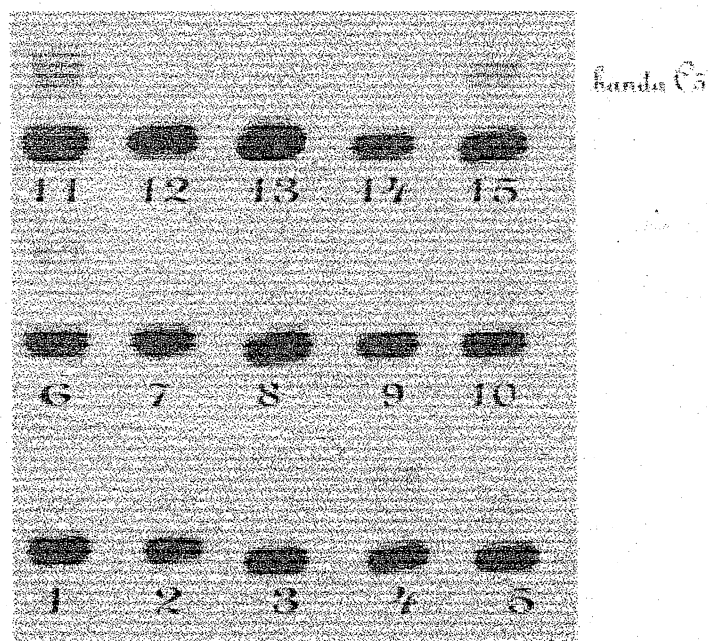


Fig.1. Visualização dos fenótipos *CHE2* C5+ (n^{os} 4, 6, 11 e 15) e *CHE2* C5-, após eletroforese em gel de ágar (pH 6,4).

Tabela 17. Frequências (\pm E.P.) dos fenótipos do loco *CHE2* em intoxicados e controles, comparadas por teste χ^2 .

| Fenótipos | Controles | | | Intoxicados | | | Total |
|---------------------------------|-----------|----------------|----------------|-------------|----------------|----------------|-------|
| | N | Frequência (%) | \pm E.P. (%) | N | Frequência (%) | \pm E.P. (%) | |
| CHE2 C5+ | 5 | 12,50 | 5,22 | 7 | 11,11 | 3,96 | 12 |
| CHE2 C5- | 35 | 87,50 | 5,22 | 56 | 88,89 | 3,96 | 91 |
| Total | 40 | 100,00 | | 63 | 100,00 | | 103 |
| $\chi^2_{(1)} = 0,01; p > 0,90$ | | | | | | | |

Tabela 18. Médias da atividade da BChE nas amostras de indivíduos controle e intoxicados, comparadas por teste t.

| Amostras | N | Atividade Média (U.I.) \pm D. P. | Mínimo | Máximo |
|-----------------------|----|------------------------------------|----------------------|--------|
| Controle | 40 | 7,96 \pm 1,49 | 4,99 | 11,53 |
| Intoxicados | 61 | 6,52 \pm 1,73 | 1,18 | 11,54 |
| $t = 4,30; p < 0,001$ | | | $F = 1,35; p > 0,30$ | |

5. DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das amostras

Os casos de intoxicação se concentraram em dois municípios principalmente, Antônio Olinto e Prudentópolis (tab. 10), provavelmente pela intensa atividade agrícola dessas regiões, que exige uma grande demanda de agrotóxicos. Além disso, deve-se levar em conta que alguns postos de saúde talvez tenham profissionais mais interessados nessa questão de intoxicação e tomem as medidas necessárias para o envio de material ao LACEN. Isto parece mostrar que em muitas das regiões rurais está faltando atenção sobre o assunto. Mesmo na região metropolitana de Curitiba verificamos uma frequência considerável de casos, 11,11%, demonstrando que a questão da intoxicação não é um problema isolado das regiões essencialmente rurais. Todos esses dados talvez devam ser levados em conta, para que se pense em medidas preventivas quanto à intoxicação por agrotóxicos, como o controle sobre o uso indiscriminado desses produtos e a orientação sobre seu manuseio adequado.

Nossos controles diferem dos intoxicados com relação ao município de origem, concentrando-se quase que exclusivamente na regional de Paranavaí (tab. 11).

Apesar das médias da idade não diferirem entre o grupo intoxicado e o controle, a variância da distribuição da idade foi maior no grupo intoxicado (tab. 12; $F = 2,54$; $p < 0,01$). A maior variância dos intoxicados se justifica pelo fato de apresentarem 12,70% de crianças (tab. 9). Além disso, a amostra controle é composta somente de maiores de idade, enquanto nos intoxicados encontram-se agricultores menores de idade, não incluídos como crianças na tabela 9.

O material proveniente do LACEN é predominantemente masculino, tanto em controles como em intoxicados. Mas mesmo assim, a amostra controle apresenta maior frequência de homens do que a de intoxicados. No grupo das 20 mulheres intoxicadas (tab. 13) incluem-se 8 crianças e 12 agricultoras. Parece existir uma forte tendência para que os agentes de saúde sejam homens.

Observando-se a tabela 14 que apresenta os graus de escolaridade, verifica-se que os intoxicados ocupam as classes menos instruídas (sem escolaridade ou pré-escolar),

enquanto os controles possuem pelo menos o 1^o grau incompleto. O número de casos sem informação para o grupo de intoxicados é muito alto (73%), sugerindo que parte dessas fichas classificadas como sem informação se refiram a casos de analfabetismo que não tenham sido notificados. É interessante notar que Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996) mostraram correlação positiva significativa entre frequência de analfabetismo nas regiões agrícolas e frequência de inibição da AChE.

Quanto ao uso de proteção para o grupo de agricultores (N = 47), em 63,83% dos casos não tivemos essa informação, o que dificulta a discussão desses dados (tab. 15). Entretanto, é possível que na categoria de ausência de informação estejam incluídos principalmente casos em que a proteção não é usada. Também com relação ao tempo de serviço para esse mesmo grupo (tab. 16) não obtivemos informação em 51,06% dos casos. Nos casos com informação, a maioria (87%) se encontra na categoria de até 20 anos de serviço.

5.2 Variáveis da BChE

Como não detectamos nenhum fenótipo não usual na amostra controle, enquanto apenas 1 foi verificado no grupo de intoxicados, podemos sugerir que essas amostras não diferiram quanto à frequência desses fenótipos.

Na tabela 19 são apresentadas comparações entre a frequência de BCHE UA encontrada no grupo intoxicado do presente estudo e três outras já relatadas na literatura. A presente frequência não difere das demais, sejam de intoxicados ou da população geral.

Na tabela 20, a frequência de fenótipos não usuais encontrada nos intoxicados do presente estudo (1,59%) é comparada com aquela (13,11%) encontrada também em intoxicados por Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996), sendo mostrado que há diferença significativa entre elas. Consideramos ser de caráter metodológico, a explicação possível para a diferença entre esses dados. A amostra de intoxicados de Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996) foi selecionada por apresentar atividade relativa da AChE igual ou inferior a 87,5%, o que caracterizou seus indivíduos como realmente intoxicados

Tabela 19. Frequências (\pm E.P.) do fenótipo BCHE UA* em uma amostra de intoxicados e em duas amostras de doadores de sangue da população de Curitiba, comparadas por χ^2 com as do presente estudo.

| Amostras | | N | Frequência \pm E.P.(%) | χ^2 (p) |
|--------------------|---|------|--------------------------|---------------|
| Intoxicados | Presente estudo | 63 | 1,59 \pm 1,59 | 1,68 (> 0,10) |
| | Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996) | 61 | 8,20 \pm 3,51 | |
| Doadores de sangue | Fadel-Picheth (1991) | 1800 | 2,22 \pm 0,35 | 0,01 (> 0,90) |
| | Allebrandt e cols., (1998) | 1470 | 2,38 \pm 0,40 | 0,01 (> 0,90) |

*Também incluímos os BCHE AK no fenótipo BCHE UA.

Tabela 20. Frequências (\pm E.P.) dos fenótipos não usuais do loco BCHE em uma amostra de intoxicados, comparadas por χ^2 com as do presente estudo.

| Amostras | | N | Frequência \pm E.P.(%) | χ^2 (p) |
|-------------|--|----|--------------------------|---------------|
| Intoxicados | Presente estudo | 63 | 1,59 \pm 1,59 | 4,53 (< 0,05) |
| | Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996)* | 61 | 13,11 \pm 4,32 | |

*BCHE UA + BCHE AK + BCHE UF.

por organofosforados ou carbamatos. No presente estudo obtivemos informação a respeito de sintomatologia indicativa de intoxicação da AChE em apenas 5 dos 63 indivíduos considerados como intoxicados. Os demais tanto poderiam apresentar a intoxicação por esses compostos como por outros tipos de agrotóxicos. Assim, nosso material não foi suficientemente bem selecionado para corresponder ao objetivo proposto no projeto desse estudo. Uma das principais razões é que o material posto à nossa disposição pelo LACEN foi deficiente em informação. Isso nos sugere modificações, caso esse estudo venha a ter sequência no futuro. Serão necessárias informações completas a respeito de sintomatologia, acrescidas da avaliação da atividade da AChE eritrocitária. Em vista dessas considerações, apesar de não termos encontrado associação das variantes não usuais da BChE e risco mais elevado de intoxicação, não podemos rejeitar a hipótese de que essas variantes predisponham à intoxicação clínica por organofosforados e carbamatos. É interessante salientar que o único indivíduo com variação não usual no grupo intoxicado apresentou sintomas gastrintestinais (atividade 6,04 U.I.).

No que se refere ao loco *CHE2*, observa-se na tabela 17 que não houve diferença nas frequências dos fenótipos em intoxicados e controles. Quando a amostra de intoxicados do presente estudo é comparada com a de intoxicados de Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996) e com a de doadores de sangue da população de Curitiba (Chautard-Freire-Maia e cols., , 1991) também não se observam diferenças estatisticamente significativas quanto à distribuição dos fenótipos do loco *CHE2* (tab. 21). No trabalho de Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996) quando se compararam as frequências dos fenótipos do loco *CHE2* em intoxicados e controles também não foram encontradas diferenças significativas. No estudo desses autores foi mostrado que o risco relativo do fenótipo não usual era 8,8% maior que o do usual, enquanto que a influência do loco *CHE2* só apareceu como significativa no fenótipo usual *CHE2* C5- que mostrou um risco relativo 3,9% maior que o *CHE2* C5+ usual.

As médias das atividades da BChE foram comparadas entre as amostras dos indivíduos controles e intoxicados (tab. 18), sendo o resultado do teste t significativo ($t = 4,30$; $p < 0,001$), pois os intoxicados apresentaram atividade média menor em relação aos controles. Inferimos que isso tenha ocorrido devido a diferenças de certas variáveis nessas duas amostras. Sugerimos que a principal razão seja a presença no grupo de intoxicados de

Tabela 21. Frequências (\pm E.P.) do fenótipo CHE2 C5+ em uma amostra de intoxicados e em uma amostra de doadores de sangue da população de Curitiba, comparadas por χ^2 com as do presente estudo.

| Amostras | | N | Frequência \pm E.P.(%) | χ^2 (p) |
|--------------------|---|------|--------------------------|--------------|
| Intoxicados | Presente estudo | 63 | 11,11 \pm 3,96 | 0,06; > 0,80 |
| | Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996) | 61 | 8,20 \pm 3,51 | |
| Doadores de sangue | Chautard-Freire-Maia e cols., (1991) | 2541 | 10,23 \pm 0,60 | 0,03; > 0,80 |

indivíduos submetidos a organofosforados e carbamatos. Sabemos sobre a diferente composição das amostras no que se refere às distribuições etária e de sexo. Como vimos na caracterização das amostras (tab. 12), apesar da idade média não diferir entre os dois grupos, a variância da distribuição de idade dos intoxicados é maior do que a dos controles. Na tabela 9 verificamos 8 crianças no grupo intoxicado e nenhuma no grupo controle. Além disso, nessa mesma tabela, sabemos que estão incluídos menores de idade na categoria de agricultor constante apenas no grupo de intoxicados. Isto implica em um maior número de pessoas com idades mais baixas no grupo de intoxicados. Simpson (1966) mostrou correlação negativa entre idade e atividade da BChE entre crianças. Assim, a diferença entre as variâncias de idade dos dois grupos do presente estudo não parece ser responsável pela menor atividade média da BChE dos intoxicados, principalmente porque a média de idade de ambas as amostras não difere. A diferença de distribuição de sexo entre os dois grupos (tab. 13), entretanto, poderia ser responsável por uma baixa na atividade média dos intoxicados, que apresentam maior frequência do sexo feminino (32%) do que o grupo controle (8%). Esse sexo foi relatado como apresentando, em média, atividade mais baixa da BChE do que o masculino, em alguns trabalhos (Simpson e Kalow, 1963; Propert e Brackenridge, 1976; Stueber-Odebrecht e cols., 1985).

Quando a atividade média da BChE da presente amostra de intoxicados é comparada com a de Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996), como mostrado na tabela 22, observa-se diferença significativa entre elas, sendo que a atividade média é maior na presente amostra. Esse dado concorda com a discussão anterior, em que já destacamos a diferença no processo de seleção de intoxicados nos dois estudos.

É interessante notar que a atividade média da BChE no grupo controle do presente estudo (8,0 U.I.) é semelhante à encontrada por Lepiensi e cols., (com. pessoal, de acordo com Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996), que foi de 7,8 U.I. em uma amostra da população de Curitiba, utilizando as mesmas condições de temperatura (37°C).

Tabela 22. Médias da atividade da BChE em intoxicados da presente amostra e de dados da literatura, comparadas por teste t.

| Amostras | N | Atividade Média (U.L) ± E. P. |
|---|----|-------------------------------|
| Presente estudo | 61 | 6,5 ± 0,2 |
| Fontoura-da-Silva e Chautard-Freire-Maia (1996) | 61 | 5,4 ± 0,2 |
| t = 3,92; p < 0,001 | | |

5.3 Seqüência do presente estudo

Essa pesquisa foi planejado para ser um estudo piloto, que nos trouxesse informações a serem aproveitadas para a elaboração de um projeto de tese de mestrado.

Os resultados aqui obtidos nos sugerem que a classificação do grupo intoxicado deve obedecer a critérios mais rigorosos. Como já foi sugerido, devemos contar com informações a respeito da sintomatologia e da atividade da AChE.

Além disso, o grupo controle deve ser preferencialmente de lavradores não intoxicados e que procuram os postos de saúde por outras razões, que não sejam a intoxicação por agrotóxico. Seu critério de escolha deve seguir pareamento de variáveis que possam interferir na atividade da BChE, como idade e sexo.

No projeto definitivo pretende-se avaliar a variabilidade do loco *BCHE* através da análise direta do DNA, que permite também a identificação de mutações não detectadas por métodos de inibição enzimática (tab. 1).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcântara, V. M.; Chautard-Freire-Maia, E. A.; Picheth, G. e Vieira, M. M. A method for serum cholinesterase phenotyping. *Rev. Brasil. Genet.* 14: 841-846, 1991.
- Aldridge, W. N. The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organophosphorus compounds. *Biochem. J.* 53:62-67, 1953.
- Allebrandt, K. V.; Souza, R. L.; Cazarote, H. C.; Soares, N. A. e Chautard-Freire-Maia, E. A. Frequência dos fenótipos *BCHE*UF1* e *BCHE*UF2* em amostras de doadores de sangue de Curitiba. Anais do 6^o *EVINCI*, Universidade Federal do Paraná, p. 80, 1998.
- Alles, G. A. e Hawes, R. C. Cholinesterases in blood of man. *J. Biol. Chem.* 133:375-390, 1940.
- Arpagaus, M.; Kott, M.; Vatsis, K.P.; Bartels, C.F.; La Du, B. N. e Lockridge, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 29:124-131, 1990.
- Augustinsson, K.B. e Nachmansohn, D. Distinction between acetylcholine-esterase and other choline ester-splitting enzymes. *Science* 110: 98-99, 1949.
- Bartels, C. F.; Jensen, F.S.; Lockridge, O.; van der Spek, A. F. L.; Rubinstein, H. M.; Lubrano, T. e La Du, B. N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 1086-1103, 1992a.
- Bartels, C. F.; James, K. e La Du, B. N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 1104-1114, 1992b.
- Brimijoin, S.; Mintz, K. P. e Alley, M. C. Production and characterization of separate monoclonal-antibodies to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* 24: 513-520, 1983.
- Brito, D. Flh. **Toxicologia Humana Geral**. 2^a ed., Ed. Ateneu, Rio de Janeiro, p. 291-293, 1988.
- Broomfield, C.A.; Maxwell, D.M.; Solana, R.P.; Castro, C.A.; Finger, A.V. e Lenz D.E. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 633-638, 1991.
- Cestarcic, E. S. Cholinesterase. In: HENRY, J. B. ed. **American Society of Clinical Pathologists Comission on Continuing Education**. Pre workshop manual. Chicago, p. 71-88, 1964.

Chautard-Freire-Maia, E. A.; Primo-Parmo, S. L.; Picheth, G.; Lourenço, M. A. C. e Vieira, M. M. The C₅ isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum. Hered.* 41: 330-339, 1991.

Dietz, A.A.; Rubinstein, H.M. e Lubrano, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocoline-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. *Clin. Chem.* 19:1309-1313, 1973.

EXTOXNET. Pesticide Information Notebook [on line], New York, Disponível: <http://ace.orst.edu/info/extoxnet> [capturado em 2 fev. 1998].

Fadel-Picheth, C. M. T. **Variabilidade do loco *BCHE* da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba.** 117p. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.

Fontoura-da-Silva, S.E. e Chautard-Freire-Maia, E.A. Butyrylcholinesterase variants (*BCHE* and *CHE2* loci) associated with erythrocyte acetylcholinesterase inhibition in farmers exposed to pesticides. *Hum. Hered.* 46: 142-147, 1996.

Gnatt, A.; Prody, C. A.; Zamir, R.; Lieman-Hurwitz, J.; Zakut, H. e Soreq, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. *Cancer Res.* 50: 1983-1987, 1990.

Greenberg, C. P.; Primo-Parmo, S. L.; Pantuck, E. J. e La Du, B. N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. *Anesth. Analg.* 81: 419-421, 1995.

Hada, T.; Muratani, K.; Ohue, T.; Imanishi, H.; Moriwaki, Y.; Itoh, M.; Amuro, Y. e Higashino, K. A variant serum-cholinesterase and a confirmed point mutation at gly-365 to arg found in a patient with liver-cirrhosis. *Internal. Med.* 31: 357-362, 1992.

Hang, H. P.; Dale, M. M. **Farmacologia.** 2^a ed., Ed. Guanabara, São Paulo, p.89-112, 1991.

Harris, H. **The principles of human biochemical genetics.** 3rd ed., Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands, p. 159-173, 1980.

Harris, H.; Hopkinson, D.A. e Robson, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature* 196:1296-1298, 1962.

Harris, H.; Robson, E. B.; Glen-Bott, A. M. e Thorton, J. A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. *Nature* 200: 1185-1187, 1963.

- Hidaka, K.; Iuchi, I.; Yamasaki, T.; Ohhara, M.; Shoda, T.; Primo-Parmo, S. L. e La Du, B. N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. *Jpn. J. Clin. Pathol. (Rinsho-Byori)* 40:535-540, 1992.
- Jensen, F. S.; Bartels, C. F. e La Du, B. N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in 2 Danish families. *Pharmacogenetics* 2: 234-240, 1992.
- Juul, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin. Chem. Acta* 19:205-208, 1968.
- Kalow, W. Familial incidence of low pseudocholinesterase levels. *Lancet* ii:576-577, 1956.
- Kalow, W. e Genest, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35:339-346, 1957.
- Kalow, W. e Staron, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can. J. Biochem. Physiol.* 35: 1315-1317, 1957.
- La Motta, R. V. e Woronick, C. Molecular heterogeneity of human serum cholinesterase. *Clin. Chem.* 17: 135-144, 1971.
- Lockridge, O.; Adkins, S. e La Du, B. N. Location of disulfide bonds within the sequence of human-serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 262: 12945-12952, 1987.
- Lockridge, O.; Eckerson, H. W. e La Du, B. N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human-serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 254: 8324-8330, 1979.
- Lockridge, O. e La Du, B. N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human-serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 257: 2012-2018, 1982.
- Masson, P. Multiple molecular forms of human plasma butyrylcholinesterase 1. Apparent molecular parameters and broad pattern of the quaternary structure. *Biochim. Biophys. Acta* 578: 493-504, 1979.
- Masson, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochem. Biophys. Acta*, 988: 258-266, 1989.
- Masson, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In: **Cholinesterases. Structure, function, mechanisms, genetics and cell biology.** American Chemical Society, Washington, p. 42-45, 1991.

- Maekawa, M.; Sudo, K.; Dey, D. C.; Ishikawa, J.; Izumi, M.; Kotani, K. e Kanno, T. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. *Clin. Chem.* 43: 924-929, 1997.
- Maekawa, M.; Sudo, K.; Kanno, T.; Kotani, K.; Dey, D. C.; Ishikawa, J.; Izumi, M.; Etoh, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in 3 compound heterozygotes. *Clin Chim Acta* 235: 41-57, 1995.
- Mendel, B.; Mundell, D. B. e Rudney, H. Studies on cholinesterase. III Specific tests for cholinesterase and pseudocholinesterase. *Bioch. J.* 37:473-476, 1943.
- McGuire, M. C.; Nogueira, C. P.; Bartels, C.F.; Lightstone, H.; Hajra, A.; van der Spek, A. F. L.; Lockridge, O. e La Du, B. N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human-serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 953-957, 1989.
- Miettinen, O. S. Proportion of disease caused or prevented by a given exposure, trait or intervention. *Am. J. Epidemiol.* 99:325-332, 1974.
- Muratani, K.; Hada, T.; Yamamoto, Y.; Kaneko, T.; Shigeto, Y.; Ohue, T. ; Furuyama, J. e Higashino, K. Inactivation of the cholinesterase gene by alu insertion - possible mechanism for human gene transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 11315-11319, 1991.
- National Institute of Environmental Health Sciences. Pesticides: Toxicity and Genetic Susceptibility [on line], Washington, Disponível: http://www.niehs.nih.gov/centers/center/prg_hilite.htm [capturado em 2 fev. 1998].
- Nogueira, C. P.; Bartels, C. F.; McGuire, M. C.; Adkins, S.; Lubrano, T.; Rubinstein, H. M.; Lightstone, H.; van der Spek, A. F. L.; Lockridge, O. e La Du, B. Identification of 2 different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 821-828, 1992.
- Nogueira, C. P.; McGuire, M. C.; Graeser, C.; Bartels, C. F.; Arpagaus, M.; van der Spek, A. F. L.; Lightstone, H.; Lockridge, O. e La Du, B. N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum-cholinesterase, GLY-117 (GGT→GGAG). *Am. J. Hum. Genet.* 46: 934-942, 1990.
- Padilla, S.; Moser, V.C.; Pope, C.N. e Brimijoin, W.S. Paraoxon toxicity is not potentiated by prior reduction in blood acetylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 117:110-115, 1992.
- Picheth, G.; Fadel-Picheth, C.; Primo-Parmo, S.L.; Chautard-Freire-Maia, E.A. e Vieira, M.M. An improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. *Biochem. Genet.* 32: 83-89, 1994.

- Primo-Parmo, S. L.; Bartels, C.F.; Wiersema, B.; van der Spek, A. F. L.; Innis, J. W. e La Du, B. N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 52-64, 1996.
- Proper, D. N. e Brackenridge, C. J. The relation of sex, age, smoking status, birth rank and parental ages to pseudocholinesterase activity and phenotypes in a sample of Australian Caucasian adults. *Hum. Genet.* 32: 181-188, 1976.
- Robinson, A. R.; Robson, M.; Harrison, A. P. e Zuelzer, W. W. A new technique for differentiation of hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 50: 745-752, 1957.
- Simpson, N. E. Factors influencing cholinesterase activity in a Brazilian population. *Am. J. Hum. Genet.* 18: 234-252, 1966.
- Simpson, N. E. e Kalow, W. Serum cholinesterase levels in families and twins. *Am. J. Hum. Genet.* 15:280-287, 1963.
- Souza, R. L. R. **Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C_{4/5}) verificada em eletroforese.** 74p. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- Stueber-Odebrecht, N.; Chautard-Freire-Maia, E. A.; Primo-Parmo, S. L. e Carrenho, J. M. X. Studies on the *CHE1* locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Santa Catarina (Southern Brazil). *Rev. Brasil. Genet.* 8: 535-543, 1985.
- Sudo, K.; Maekawa, M.; Akizuki, S.; Magara, T.; Ogasawara, H. e Tanaka, T. Human butyrylcholinesterase L330I mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 240: 372-375, 1997.
- Sudo, K.; Maekawa, M.; Kanno, T.; Akizuki, S. e Magara, T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype: possible Japanese type alleles. *Clin. Biochem.* 29: 165-169, 1996.
- The Environmental Genome Project Candidate Gene List. Gene: Paraoxonase [on line], Washington,Disponível: <http://www.niehs.nih.gov/envgenom/genes.htm#Paranoxase> [capturado em 28 out. 1998].
- Van Ros, G. e Vervoort, T. Frequencies of the "atypical" and C₅ variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C₅ variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 53: 633-644, 1973.
- Wolfe, A.D.; Blick, D.W.; Murphy, M.R.; Miller, S.A.; Gentry, M.K.; Hartgraves, S.L. e Doctor B.P. Use of cholinesterases as pretreatment drugs for the protection of rhesus monkeys against soman toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 117:189-193, 1992.

Woolf, B. On estimating the relation between blood group and disease. *Am. Hum. Genet.* 19:251-253, 1955.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Ficha de dados ocupacionais e clínicos dos pacientes submetidos ao exame da atividade da butirilcolinesterase.

ESTADO DO PARANÁ

Secretaria de Estado da Saúde

Instituto de Saúde do Paraná

LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO

Rua Ubaldino do Amaral, 545 - telefone: (041) 264-4448

80.060.190 - Curitiba - Paraná

SEÇÃO DE TOXICOLOGIA FICHA DE DADOS OCUPACIONAIS E CLÍNICOS DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA COLINESTERASE

1- Identificação:

NOME:

DATA NASCIMENTO: ____/____/____ SEXO: MASC () FEM ()

ENDEREÇO:

FONE PARA RECADO:

MUNICÍPIO:

PROCEDÊNCIA:

NOME DO MÉDICO:

DATA DA COLETA: ____/____/____

DATA DE ENTRADA: ____/____/____

DATA DA ANÁLISE: ____/____/____

RESULTADO:

1 - Dados ocupacionais:

Local de trabalho:

Atividade desenvolvida:

Tempo de serviço:

Atividade anterior: tempo de serviço:

Há quanto tempo trabalha no ramo:

Usa equipamento de proteção individual: () sim () não qual?

2 - Dados complementares:

Está afastado do emprego? () sim () não, há quanto tempo?

Nos últimos 3 meses foi acometido de alguma doença? () sim (...) não qual?

Toma ou tomou alguma medicação? () sim () não, qual?

Há quanto tempo?

Responsável pela coleta:

Apêndice 2. Codificação dos dados do LACEN

| Colunas | Variável | |
|---------|---|--------------|
| 1-3 | n ^o de identificação do LACEN | |
| 4 | intoxicação: 1-sem intoxicação, 2-com intoxicação suposta | |
| 5-6 | idade: 99 - desconhecida | |
| 7 | sexo: 1-feminino, 2-masculino e 9-desconhecido | |
| 8 | escolaridade: 1 - s/ escolaridade | |
| | 2 - pré-escolar | |
| | 3 - 1 ^o grau incompleto | |
| | 4 - 1 ^o grau completo | |
| | 5 - 2 ^o grau incompleto | |
| | 6 - 2 ^o grau completo | |
| | 7 - 3 ^o grau incompleto | |
| | 8 - 3 ^o grau completo | |
| | 9 - sem informação | |
| 9-11 | município: (1-399), 999 - desconhecido | |
| 12-13 | regional de saúde: (1-22), 99 - desconhecida | |
| 14-17 | data da coleta ou de entrada (mês e ano) | |
| 18 | profissão: 1 - criança | |
| | 2 - agricultor | |
| | 3 - agente de saúde | |
| | 4 - outras | |
| | 9 - desconhecida | |
| 19-20 | tempo de lavrador: 99 - desconhecido | |
| 21 | proteção: 1 - sim | |
| | 2 - não | |
| | 9 - desconhecida | |
| 22-23 | sintomatologia: 1 - gastrointestinal | 11 - (1 e 2) |
| | 2 - sistema respiratório | 12 - (1 e 3) |
| | 3 - sistema nervoso | 13 - (1 e 4) |
| | 4 - sistema urinário | 14 - (1 e 5) |
| | 5 - dermatológica | 15 - (1 e 6) |
| | 6 - sistema circulatório | 16 - (1 e 7) |
| | 7 - hematológica | 18 - (2 e 3) |
| | 99 - desconhecida | 19 - (2 e 4) |
| | | 20 - (2 e 5) |
| 24-28 | atividade da BChE (LACEN) | |